

Contribution à la valorisation des margines des huileries par fermentation / S. Omary ; sous la direction de dr A. Bassal. — Extrait de : Annales de recherche scientifique. — N° 5 (2004), pp. 311-321.

Bibliographie. Figures. Tableaux.

I. Huiles végétales — Industrie. II. Industries huilières. III. Huiles essentielles.

Bassal, A.

PER L1049 / FA193886P

## CONTRIBUTION À LA VALORISATION DES MARGINES DES HUILLERIES PAR FERMENTATION

**S. OMARY**

*Université Saint-Esprit de Kaslik*

*Faculté des Sciences Agronomiques*

*B. P. 446 Jounieh, Liban*

**Sous la direction de Dr A. BASSAL**

*Institut de Recherches Agronomiques du Liban, Fanar*

*B. P. 90-1965 Jdeidet El-Metn, Liban*

### RÉSUMÉ

*Les eaux de végétation provenant de l'extraction des huiles d'olives présentent un effet polluant très accentué dans la région méditerranéenne. Ceci est essentiellement dû à la présence en grande quantité de composés organiques, lesquels résultent en une valeur de la demande chimique en oxygène élevée (152 g/l). Dans l'étude actuelle, la valorisation des eaux de végétation est réalisée par fermentation avec la levure "Yarrowia lipolytica". Cette dernière a montré une bonne croissance sur différents volumes de margine et avec différents taux d'inoculum. Sa capacité de croître varie avec le degré de maturité des olives : sa croissance sur la margine provenant d'olives noires a été plus importante. Les résultats des analyses chimiques, effectuées avant et après fermentation sur deux margines provenant de deux différents procédés d'extraction, ont montré la capacité de "Yarrowia lipolytica" de réduire la demande chimique en oxygène de 74 % durant 24 heures, et d'assimiler les sucres et les lipides pour produire sa propre biomasse, estimée comme protéines unicellulaires utiles pour l'alimentation animale, voire humaine. Durant ce processus, une réduction non significative des polyphénols a été remarquée, la levure n'ayant aucun effet sur les composés phénoliques.*

**Mots-clés :** *Eaux de végétation de l'huile d'olives, "Yarrowia lipolytica", Biomasse, DCO, Sucres, Lipides.*

## ABSTRACT

*Waste waters from olive oil processing may cause severe pollution in Mediterranean area, since they have a high level of chemical oxygen demand (COD) (152 g/l). For this study, "Yarrowia lipolytica" was grown on waste waters inducing its valorization. This yeast showed a good growth on different volumes of olive oil mill waste waters with different inoculum rates. Furthermore, its capacity of growing on olive oil mill waste water resulting from the extraction of black olives was more significant. Chemical analyses were executed before and after fermentation on two distinctive olive oil mill waste waters obtained from two different extraction processes; results showed the capacity of "Yarrowia lipolytica" to reduce the chemical oxygen demand of about 74% during 24 hours and to assimilate sugars and lipids needed to produce its biomass estimated like single cell protein used in feed nutrition. During this process, a non significant reduction of polyphenols was observed, this yeast having no effect on the phenolic compounds.*

**Key words :** *Olive oil mill waste waters, "Yarrowia lipolytica", Biomass, DCO, Sugars, Lipids.*

## INTRODUCTION

Les eaux de végétation sont les eaux résiduelles provenant du processus d'extraction de l'huile d'olives. Il s'agit d'une émulsion relativement stable appelée "*margin*", composée de l'eau contenue dans le tissu du fruit d'olive, de l'eau utilisée durant les différentes étapes d'extraction de l'huile, de pulpes d'olives, de mucilage et de pectine, etc. (Scioli and Vollaro, 1997). Elle est caractérisée par une odeur spécifique forte d'huile d'olives ainsi qu'une couleur intensivement foncée. Cependant, la composition de *margin* change considérablement en qualité et quantité suivant plusieurs facteurs (Lacomelli, 2000) : type de procédé de production, variétés d'olives, temps de cueillette et étape de maturité.

Toutefois, des teneurs élevées des margines en substances organiques tel que : sucres, lipides, acides, pectines et tanins, et en polyphénols, lesquels sont responsables de la valeur élevée de DCO, doivent être considérés comme problématiques pour le traitement de ces eaux résiduelles étant donné qu'il y a éli-

mination non contrôlée des eaux usées, directement dans les jets ou les fleuves les plus proches.

Diverses méthodes de traitement de margine ont été élaborées durant la dernière décennie, plus particulièrement un traitement anaérobie et un autre aérobie. Ce dernier consiste en une fermentation des margines par des levures capables de se développer sur ce milieu en dégradant la majeure partie des matières organiques présentes, réduisant ainsi son degré de pollution mesuré par la demande chimique en oxygène (DCO). La biomasse produite estimée comme protéines unicellulaires est par suite utilisée dans l'alimentation animale, voire humaine.

Scioli et De Felice (1993 ; cité par Scioli et De Felice, 1997) ont examiné la croissance de cinq différentes levures sur les eaux de végétation et ont évalué leur potentiel de réduire la DCO et de produire de biomasse. La levure montrant le meilleur potentiel de croissance sur ce milieu s'est révélée être "*Yarrowia lipolytica*" (Scioli and De Felice, 1993 ; cité par Scioli et De Felice, 1997).

Au Liban, une production de margine de 21000 à 42000 mètres cubes a été recensée par le Ministère d'Agriculture (1999) : la superficie cultivée d'olivier est en croissance, accompagnée d'une augmentation de la production d'huile d'olives et par conséquent de la production de margine.

Le but de ce mémoire est de réaliser un système efficient de valorisation des eaux de végétation de l'huile d'olives par "*Yarrowia lipolytica*" afin d'examiner sa croissance avec un minimum de substrats ajoutés, réduisant par suite son effet polluant tout en produisant des protéines unicellulaires utiles pour l'usage industriel, surtout alimentaire. Ainsi, cette étude traite la croissance de "*Yarrowia lipolytica*" sur un milieu synthétique d'une part ; d'autre part sur la margine suivant différents volumes, différents taux d'inoculum et suivant le type d'olives. De plus, des analyses chimiques sont entretenues suite à une culture de "*Yarrowia lipolytica*" sur deux margines, l'une provenant d'olives vertes, l'autre d'olives noires. Ces analyses comportent le dosage des sucres, détermination des matières lipidiques, dosage des polyphénols, dosage d'azote par Kjeldhal, détermination de la DCO et de matières sèches en suspension.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les margines ont été collectées de deux différentes huilleries (l'une continue et l'autre discontinue) de la région de Akkar au mois de septembre et d'octobre 2001 selon le degré de maturité.

La souche "*Yarrowia lipolytica*" utilisée a été procurée du laboratoire de l'Institut National Agronomique de Paris Grignon (INA-PG). La culture mère est entretenue sur un milieu agar-agar (YDA 1 % glucose) et conservée dans un réfrigérateur à une température de 5°C.

L'étude expérimentale a été réalisée dans les laboratoires de l'Institut de Recherches Agronomiques du Liban (IRAL) à Fanar.

### **Analyses microbiologiques**

La margine utilisée pour les différentes analyses n'a subi aucun pré-traitement.

#### ***Inoculation et fermentation***

Une pré-culture est préparée dans un bouillon de culture, puis montée sur un agitateur rotatif réglé à 160 tours/minute à une température de 27°C ± 1°C pendant 48 heures. 0,6 % de sulfate d'ammonium sont ajoutés à l'échantillon de margine afin de compenser la pénurie d'azote, ainsi que 0,1 % d'extrait de levures apportant une source de nutriments organiques de croissance (vitamines). Le pH est ajusté à 5 en ajoutant du NaOH (1M) au début de la fermentation, en cas de nécessité ; le pH est mesuré à l'aide d'un pHmètre électrique de type Mettler, Toledo 320 (précision ± 0,01). Le mélange, pasteurisé à une température de 75°C pendant 1 heure et demi, est ensuite additionné de la pré-culture. Le tout est agité sur un agitateur rotatif réglé à 160 tours/minute à une température de 27°C ± 1°C pendant 48 heures.

#### ***Dénombrement***

Plusieurs prélèvements sont réalisés (après 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24 et 48 heures) permettant de suivre la progression de la croissance cellulaire des levures par comptage des unités formatrices de colonies (UFC) sur milieu solide.

#### ***Détermination du taux spécifique de croissance***

Le taux spécifique de croissance ( $\mu_m$ ) représente la vitesse spécifique de croissance. Dans la phase exponentielle ou logarithmique, la vitesse de croissance est fonction de la concentration cellulaire selon l'équation suivante :

$$2,303 \log (X/X_0) = \mu_m * (t-t_0)$$

où t : Temps à la fin de la phase exponentielle, exprimé en heures ;

$t_0$  : Temps au début de la phase exponentielle, exprimé en heures ;

X : Concentration cellulaire au temps t ;

X : Concentration cellulaire au temps  $t_0$ .

### ***Matières sèches en suspension***

La matière sèche a été déterminée par filtration sous vide, lavage à l'eau puis séchage à l'étuve (Memmert, Allemagne) à 105°C pour une période de 15 minutes à 24 heures selon la méthode décrite dans "Standard methods for the examination of water and wastewater" (1992).

La biomasse a été déterminée aussi par filtration sur une membrane de 0,2  $\mu\text{m}$ . Après lavage à l'eau, la membrane a été séchée à l'étuve à 105°C pendant 24 heures.

### **Analyses chimiques**

#### ***Demande chimique en oxygène (DCO)***

La DCO, exprimée en g/l, a été déterminée selon la méthode décrite dans AOAC (1990) : les substances organiques sont oxydées par le dichromate de potassium ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) en présence d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) à 150°C avec du sulfate d'argent ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ) comme catalyseur et du sulfate de mercure ( $\text{HgSO}_4$ ) pour éliminer l'interférence du chlore. L'excès du dichromate est titré avec  $\text{Fe}^{2+}$  utilisant l'orthophénantroline comme indicateur.

#### ***Azote et protéines***

La teneur en azote, exprimée en g/l, a été déterminée par la méthode de Kjeldahl décrite dans "Standard methods for the examination of water and wastewater" (1992). La teneur en protéines est obtenue par multiplication de l'azote par un facteur de conversion généralement égale à 6,25.

#### ***Matières lipidiques et huile***

La teneur en lipide, exprimée en g/l, a été déterminée de la manière suivante selon la méthode décrite par "Blight & Dyer" (1959) : Quarante ml de méthanol et 20 ml de chloroforme sont ajoutés à 10 g de margine ; le tout est homogénéisé et additionné de 20 ml d'eau distillée. Le mélange ainsi formé est centrifugé à 3000 tours par minute pendant 10 minutes ; la phase supérieure obtenue contenant l'huile est séchée à l'étuve à 105°C puis pesée.

### ***Sucres***

Les sucres sont identifiés quantitativement et qualitativement par un CLHP (Shimadzu LC-10AD) selon la méthode décrite dans AOAC (1990). La phase mobile est formée d'un mélange d'acétonitrile : eau (75/25). Le débit est 1 ml/min. Le détecteur utilisé est un détecteur à indice différentiel (RID-IDA Shimadzu). La colonne utilisée est supelco LC-NH2 : 25 cm \* 4,6 cm ; 5µm.

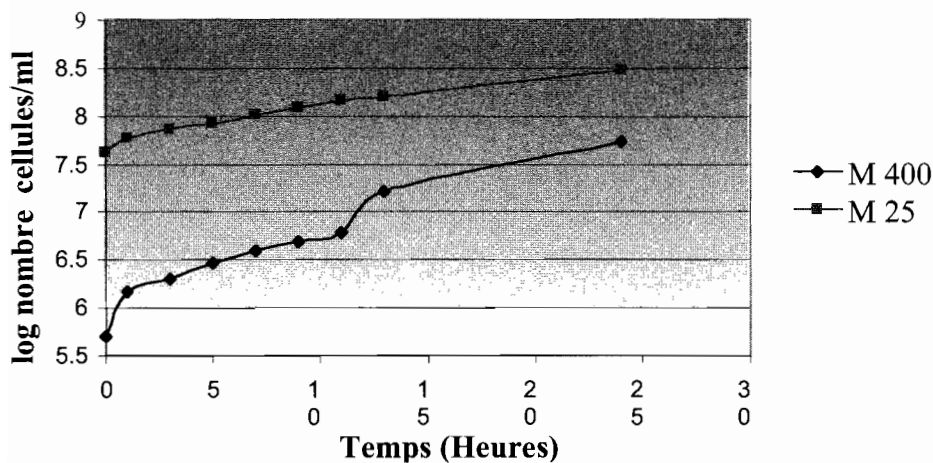
### ***Polyphénols totaux***

Les polyphénols totaux ont été dosés selon la méthode décrite par Ryan *et al.* (1999) : les polyphénols totaux sont d'abord extraits par chromatographie solide-liquide, puis dosés par spectrophotométrie à 765 nm en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ils sont exprimés en acide p-hydroxybenzoïque.

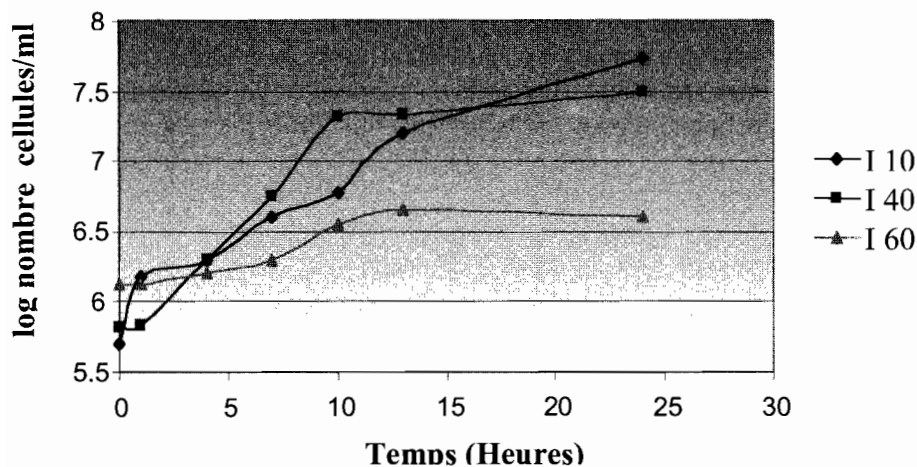
## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

Les résultats obtenus suite à la culture de "*Yarrowia lipolytica*" ont montré la capacité de cette levure de croître sur des différents volumes de margine (Fig. 1) et avec différents taux d'inoculum (Fig. 2).

Cependant, le meilleur développement s'est montré sur la margine provenant des olives noires, étant donné que le taux spécifique de croissance sur cette dernière est de 0,25 h<sup>-1</sup> tandis que celui obtenu sur la margine provenant des olives vertes est de 0,10 h<sup>-1</sup> (Fig. 3). Ceci est expliqué par l'atténuation de l'effet inhibant des polyphénols qui sont dégradés avec la maturité des olives.

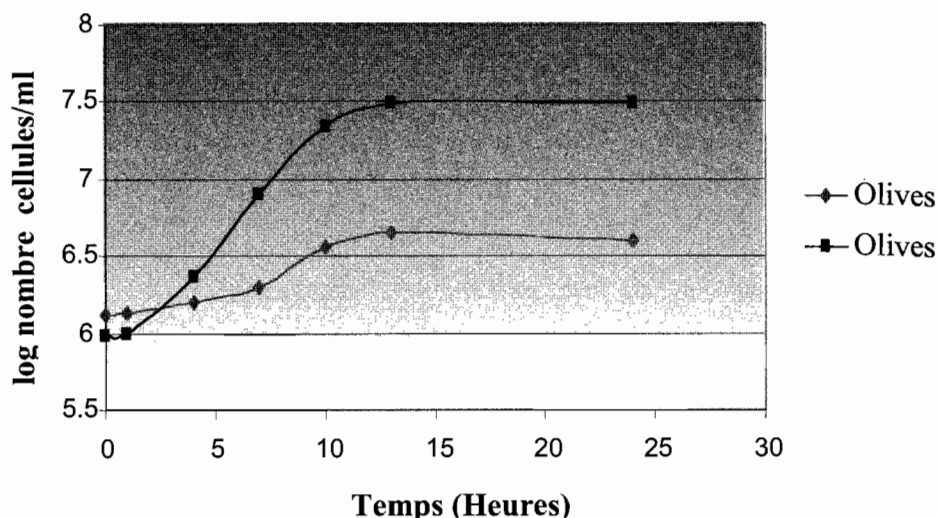


**Figure 1.** Croissance de "*Yarrowia lipolytica*" sur 25 ml de margine (M 25 ml) et sa croissance sur 400 ml de margine (M 400 ml).



**Figure 2.** Influence du taux d'inoculum sur la croissance de "*Yarrowia lipolytica*".





**Figure 3.** Influence du type d'olives sur la croissance de "*Yarrowia lipolytica*".

Quant aux analyses chimiques réalisées, suite à deux cultures de "*Yarrowia lipolytica*" sur deux margines provenant de deux huileries différentes, l'une presse, l'autre centrifuge, elles nous renseignent sur la variation des constituants des deux margines avant et après fermentation (Tab. 1).

**Tableau 1 :** Comparaison entre les constituants de margine avant et après fermentation.

	Avant fermentation		Après fermentation	
	Margine 1	Margine 2	Margine 1	Margine 2
pH	4,8	5,2	-	-
UFC	820000*	1640000*	13600000	6900000
DCO (g/l)	-	152	-	39,52
Matières sèches en suspension ** (g/l)	19,43	0,4	44,68	11,44
Azote (g/l)	0,134	0,109	1,738	1,505
Lipides (g/l)	23,26	28,27	10,8	13,16
Polyphénols totaux exprimés en acide p-hydroxybenzoïque (g/l)	24,4	28,269	-	26,346
Fructose (g/l)	3,617	0,723	1,874	1,783
Glucose (g/l)	5,217	3,102	0	0
Saccharose (g/l)	11,288	11,465	13,568	14,938

\* Ces valeurs ont été obtenues au début de la fermentation.

\*\* Ces valeurs ont été obtenues après séchage du filtrat.

Une réduction de la DCO de 74 % est détectée après traitement par "*Yarrowia lipolytica*" présentant ainsi une solution aux problèmes environnementaux causés par leur déversement dans les eaux de rejets. Cependant, cette réduction est accompagnée par un épuisement du glucose prouvant ainsi la capacité de "*Yarrowia lipolytica*" d'utiliser ce substrat. De même pour les lipides qui ont été assimilés par la levure dans le but de produire sa propre biomasse. Cette assimilation va de pair avec la production de matières sèches (25,25 g/l) estimées comme protéines unicellulaires d'intérêt accentué pour l'alimentation animale, voire humaine. De plus, les analyses chimiques ont montré la richesse de la margine en polyphénols, lesquels sont des composés difficilement biodégradables. Une réduction non significative de ces composés a été mesurée (1,923 g/l). En terme d'azote, une augmentation s'est observée, laquelle est probablement due à l'ajout de sulfate d'ammonium au début de la fermentation et la dissociation de certaines particules.

## CONCLUSION

Le traitement de la margine par la levure "*Yarrowia lipolytica*" s'est révélé efficace pour la réalisation d'un système de valorisation des eaux de végétation de l'huile d'olives, tout en présentant l'avantage de produire de la matière sèche estimée comme protéines unicellulaires d'intérêt accentué pour l'alimentation animale, voire humaine.

Ainsi, la réduction de la demande chimique en oxygène de 74 % ainsi que l'absence de sucres et de lipides, offrent l'opportunité de filtrer à l'aide de membranes adéquates les effluents obtenus suite à la culture de "*Yarrowia lipolytica*" avant leur rejet dans les fleuves ou avant leur déversement dans les eaux d'égouts.

Ces résultats peuvent avoir des implications industrielles à bon marché dans les pays producteurs d'huile d'olives dont le Liban fait partie.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AOAC, 1990. *Official method of analysis*. Chemical oxygen demand, 973, 40.
- AOAC, 1990. *Official method of analysis*. Sugars in plants, 922.02-931.02.
- BLIGHT, E.G. et DYER, W.J., 1959. A rapid method for lipid extraction for use in determining vitamin E-lipid ratios. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 : 911-917.
- LACOMELLI, A., 2000. Olive mill wastewater & SAP adopted by BARCON Contracting Parties. Workshop Agro-industry development in the Coastal Areas, with special focus on the olive oil industry. Beirut, Lebanon, 4-6 december 2000.
- Ministère de l'Agriculture Libanaise, 1999. Statistique agriculture courante, Rapport annuel. Beyrouth, Liban.
- RYAN, D., ROBAROB, K, et LAVEE, S., 1999. Changes in phenolic content of olive oil during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, 34 : 265-274.
- SCIOLI, C. et VOLLARO, L., 1997. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Water Resources*, 31 (10) : 2520-2524.
- Standard methods for the examination of water and wastewater, 1992. American Public Health Association, 17<sup>th</sup> edition